




Exhibit 18

ANTICARCINOGENIC AGENT**Publication number:** JP62145026**Publication date:** 1987-06-29**Inventor:** KAWAI YASUO; SUEKARA NOBUO; OKAZAKI HIDE**Applicant:** ADVANCE KK**Classification:****- international:** A61K35/74; A61P35/00; A61P39/02; A61K35/66;
A61P35/00; A61P39/00; (IPC1-7): A61K35/74**- European:** A61K35/74; C12R1/01; C12R1/225; C12R1/46**Application number:** JP19850284329 19851219**Priority number(s):** JP19850284329 19851219**Also published as:** EP0228861 (A2)
 EP0228861 (A3)
 EP0228861 (B1)**Report a data error here****Abstract of JP62145026**

PURPOSE: To provide an anticarcinogenic agent containing microbial cell of Streptococcus genus, Bifidobacterium genus or Lactobacillus genus as an active component and capable of effectively lowering dimethylnitrosamine known as a carcinogenic substance. **CONSTITUTION:** The objective anticarcinogenic agent contains the cells of a strain belonging to Streptococcus genus (e.g. Streptococcus faecium, Streptococcus faecalis, etc.), Bifidobacterium genus (e.g. Bifidobacterium adpressantis) or Lactobacillus genus (e.g. Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus salivarius, etc.) as an active component. The above microbial cell remarkably effectively decreases the level of dimethylnitrosamine in the body and is useful as a preventive for cancer including the cancer of digestive organ (especially gastric cancer and hepatic cancer).

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-145026

⑬ Int.Cl.¹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)6月29日

A 61 K 35/74

ADU

7138-4C

7138-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 抗発癌剤

⑯ 特 願 昭60-284329

⑰ 出 願 昭60(1985)12月19日

⑱ 発 明 者 河 合 康 雄 厚木市毛利台2-8-12

⑲ 発 明 者 末 柄 信 夫 神奈川県津久井郡城山町川尻3256-5

⑳ 発 明 者 岡 崎 秀 相模原市下九沢767

㉑ 出 願 人 株式会社アドバンス 東京都中央区日本橋小舟町5番7号

明 細 書

1. 発明の名称

抗発癌剤

2. 特許請求の範囲

- (1) ストレプトコッカス属、ビフィドバクテリウム属、及びラク
トバチルス属のいずれかに属する微生物の菌体を有効成分と
して含有することを特徴とする抗発癌剤。
- (2) 菌体微生物が、ストレプトコッカス・フェシウム、同フェカ
ーリス、同エビウム、同ミチリス、同サリヴァリウス、同ボ
ービス、同エクイナス、ビフィドバクテリウム・アドレセン
ティス、同ブレベ、同ロンガム、ラクトバチルス・アシドフィ
ルス、同アランタルム、同ブレビス、同カゼイ、同ファーメ
ンタム、同サリヴァリウス、同ヘルベティクスより成る群か
ら選択される1種又は2種以上であることを更に特徴とする
特許請求の範囲第(1)項に記載の抗発癌剤。
- (3) 菌体微生物がストレプトコッカス・フェシウムAD1008(F
ERM P-8569)、同フェカールリスAD8005(FERM P-85
72)、同エビウムAD8007(FERM P-8574)、ビフィドバ
クテリウム・ブレベAD8053(FERM P-8573)、同アドレ

センティスAD8052(FERM P-8574)及び/又はラクトバ
チルス・アシドフィルスAD8008(FERM P-8563)、同サ
リヴァリウスAD8009(FERM P-8566)であることを、更
に特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の抗発癌剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、有効成分としてストレプトコッカス属に属する微生
物、ビフィドバクテリウム属に属する微生物/又はラクトバチル
ス属に属する微生物の菌体を含有する抗発癌剤に関する。

今日、日本人の死亡率の第1位は癌による死亡であり、とくに
消化器癌が多い。これら癌の治療・予防薬としては、免疫賦活剤
を初めとして幾つかが提案されているが、死亡の減衰はなく増え
つつはいる現状である。これらは抗癌効果及び副作用等の点で
必ずしも充分満足し得るものとはいえず、より効果的な薬剤の
需求が一般と高まっている。上記に鑑み、本発明者は、癌患研
究の結果、ストレプトコッカス属、ビフィドバクテリウム属又は
ラクトバチルス属に属する微生物の菌体及び死菌体が、消化器
癌の原因物質である強力発癌物質ジメチルニトロソアミンを効果
的に低下せしめ得るものであり、且つ、その起源が癌細胞内組織
であるこれらの菌体は、癌口では実質的親和性であることを知見し、
本発明に到達したものである。

特開昭62-145026(2)

以下、本発明に係わる微生物の種別と菌学的性質、スクリーニング方法、菌体調製法及び薬理作用等につき詳細に分類する。

微生物

ストレプトコッカス属、ビフィドバクテリウム属又はラクトバチルス属に属する微生物であり、就中、ストレプトコッカス・フェシウム(*Streptococcus faecium*)、同フェカリス(*faecalis*)、同エビウム(*avium*)、同ニティス(*nitilis*)、同エキナス(*equinus*)、同サリヴァリウス(*salivarius*)、同ボービス(*bovis*)、同デュランス(*durans*)、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス(*Bifidobacterium adolescentis*)、同ブレベ(*breve*)、同ロングム(*longum*)、同インファンティス(*infantis*)、同ビフィダム(*bifidum*)、同サーモフィラム(*thermophilum*)、同シュードロングム(*pseudo-longum*)、同コリネファルム(*coryneforme*)、同アステロイデス(*asteroides*)、同インディカム(*indicum*)、同スイス(*swiss*)、同ラクトバチルス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)、同ファーマンタム(*fermentum*)、同サリヴァリウス(*salivarius*)、同プランタム(*plantarum*)、同カゼイ(*casei*)、同ブレビス(*brevis*)、同ブルガリクス(*bulgaricus*)、同ヘルベティクス(*helveticus*)等が使用される。

菌学的性質

本発明微生物の一般的菌学的性質は、同一分類につき公知各文献の示すものと同一の諸性質を有する。

すなわち、本発明微生物の一般的菌学的性質及び培養法等に関しては、下記諸文献が参照される。

- 1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., 490-678 (1974)
- 2) Int. J. Syst. Bact., 16, 114 (1966)
- 3) Poupard, J. A., Hussain, I., and Norris, R. P.: Bacteriol. Rev. 31, 126-165 (1973)
- 4) 光岡知足、日本細菌誌 24, 261-280 (1969)

ここで前出菌株につきその主な菌学的性状を要約して第2乃至第4表に示す。

以下余白

これらのうち特に有用な菌株を数工研受託番号と共に表示すれば、下記の通りである。

第1表

菌株名	受託番号
<i>Streptococcus faecium</i> AD1008	FERM P-8569
<i>Streptococcus avium</i> AD2001	FERM P-8570
<i>Streptococcus nitilis</i> AD7002	FERM P-8571
<i>Streptococcus faecalis</i> AD8005	FERM P-8572
<i>Bifidobacterium breve</i> AD0055	FERM P-8573
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> AD0052	FERM P-8574
<i>Bifidobacterium longum</i> AD0058	FERM P-8582
<i>Lactobacillus acidophilus</i> AD0005	FERM P-8563
<i>Lactobacillus fermentum</i> AD0007	FERM P-8564
<i>Lactobacillus casei</i> AD0008	FERM P-8566
<i>Lactobacillus salivarius</i> AD0009	FERM P-8568
<i>Lactobacillus plantarum</i> AD0010	FERM P-8567
<i>Lactobacillus brevis</i> AD0011	FERM P-8565

特開昭62-145026(3)

表2表

	<i>S. faecalis</i> A D 1008	<i>S. faecalis</i> A D 9008	<i>S. avium</i> A D 2007
グラム染色	+	+	+
カタラーゼ(煮沸血液存在下)	-	+	-
10℃での増殖	+	+	+
45℃での増殖	+	+	+
pH9.6での増殖	+	+	+
6.5% NaClでの増殖	+	+	+
40%胆汁における増殖	+	+	+
1/4000亜硝酸酸での増殖	-	+	-
0.1%メチレンブルーミルクでの増殖	+	+	-
炭水化物発酵			
アラビノース	+	-	+
グリセリン	-	+	+
ラフィノース	+	+	+
ソルビット	-	+	+
エステリン加水分解	+	+	+
アルギニン加水分解	+	+	-

	<i>S. subsp. novus</i> A D 9002	<i>S. faecalis</i> A D 9008	<i>S. faecalis</i> A D 9008
グラム染色	+	+	+
カタラーゼ	-	-	-
10℃での増殖	+	+	+
45℃での増殖	+	+	+
pH9.6での増殖	+	+	+
6.5% NaClでの増殖	+	+	+
40%胆汁における増殖	+	+	+
1/4000亜硝酸酸での増殖	-	+	-
0.1%メチレンブルーミルクでの増殖	+	+	-
炭水化物発酵			
アラビノース	+	-	+
グリセリン	-	+	+
ラフィノース	+	+	+
ソルビット	-	+	+
エステリン加水分解	+	+	+
アルギニン加水分解	+	+	-

特開昭62-145026(4)

これらの微生物の培養は上記の通り富法によるものであるが、例えば
ストレプトコッカス属の微生物とラクトバチルス属の微生物はロゴサ
(Rogosa)液体培地(注1)、ビフィドバクテリウム属の微生物はGAM
液体培地(注2)にて、ストレプトコッカス属及び、ラクトバチルス
属は好氣的又は嫌氣的に、そしてビフィドバクテリウム属は厭氣的に
培養し、得られた培養液を適宜分離して、その菌体が採取される。

注1)

ロゴサ液体培地の組成

蒸留水1ℓ中に	
トリブチケース	10g
酵母エキス	5g
トリプトース	3g
K ₂ HPO ₄	3g
KH ₂ PO ₄	3g
酢酸ナトリウム ^(*)	1g
クエン酸三アンモニウム	2g
ツイーン80	1g
グルコース	20g
レシステイン塩酸塩	0.3g
塩類溶液 ^(**)	5ml
(pH 7.12(15分間加熱滅菌))	
*)酢酸ナトリウムはストレプトコッカスの場合は不要	
**)塩類溶液、蒸留水100mlに	
MgSO ₄ ・7H ₂ O	11.5g
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.68g
MnSO ₄ ・2H ₂ O	2.4g

表4及

L. acidophilus AO400

グラム陽性	+
グルコースからのガス生成	-
15℃での発酵	-
45℃での発酵	+
炭水化物発酵	+
アラビノース	-
キシロース	-
ラムノース	-
リボース	-
マンノース	+
マルクトース	+
ガラクトース	+
シュクロース	+
マルトース	+
セロビオース	+
ラクトース	+
トレハロース	-
ノビチオース	+
ラフィノース	-
ノゾトース	-
デキストリン、デンプン	V = 不定
マンニト	-
ソルビット	-
エスタチン	+
チロシン	+
アミダグリン	+

注2)

GAM 液体培地の組成

GAMブイヨン

「日本製薬株式会社」コード05422

	59.0g(1ℓ分)
ペプトン	10.0g
ダイズペプトン	3.0g
プロテオースペプトン	10.0g
消化血漿末	13.0g
酵母エキス	5.0g
肉エキス	2.2g
肝臓エキス末	1.2g
ブドウ糖	3.0g
リン酸二水素カリウム	2.5g
塩化ナトリウム	3.0g
溶性デンプン	5.0g
レシステイン塩酸塩	0.3g
チオグリコール酸ナトリウム	0.3g

(pH 7.3 ± 0.1)

121℃ 15分間加熱滅菌

得られた菌体は生菌体または加熱処理等による死菌体としてい
ずれもそのまま薬剤として利用することができるが、前者は処理等
により破砕菌体として利用に供されてもよい。したがって、本発
明に於ける「死菌体」とはこれら破砕菌体の全部又は一部分をも
包含するものである。

スクリーニング方法

光岡(1971): 感染症学会雑誌, 44, 466に記載の方法に準ずる。

すなわち、上記文献に記載の通り、健康人の糞便を下記の組成の
希釈液で10倍に希釈し、ストレプトコッカスはR₁M₁Nagar(van
der Wiele-Korsten, J. A. A., and K. C. Winkler; J. Med.
Microbiol., 9, 431(1975)、ラクトバチルスはLBS agar(BB
L)、ビフィドバクテリウムはMPN agar(Tanaka, R. et al.
Appl. Environ. Microbiol., 40, 866-869(1980))、これらの培
地組成は下記の通りに塗布、37℃ 48-120時間培養し、生成コ
ロニーをカウント、個体としてひろい、コロニー形、カタラーゼ活
性、グラム染色性、菌体の形状を観察し、生理的、生化学的及び
血清学的性状を検査して分類同定した。

特開昭62-145026 (5)

希釈液

KH_2PO_4	4.5g
Na_2HPO_4	6.0g
レーシステイン塩酸塩	0.5g
ツィーン80	0.5g
寒天	1.0g
精製水	1,000ml

KM_N agarの組成

Na_2N_2	0.2g
トリプトース	15.0g
肉エキス	3.0g
NaCl	5.0g
スキムミルク	18.0g
ニュートラルレッド	4.0mg
カナマイシン	24mg
寒天	18g
pH 7.0、1,000ml処方	

$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4g	0.5ml
NaCl	0.5g	
蒸留水	250ml	

0.1% リサズリン	0.1ml
ビオチン	0.01mg
パントテン酸カルシウム	0.2mg
リボフラビン	0.1mg
アデニン	0.1mg
グアニン	0.1mg
キサンチン	0.1mg
ウラシル	0.1mg
ツィーン80	0.1g
10% ビルビン酸	0.1ml
8% Na_2CO_3	5.0ml
3% レーシステイン塩酸塩	1ml
ナリジクス酸	1.0mg
1.5% ブロムクレゾールパープル	0.1ml
寒天	2g
pH = 6.8、1,000ml処方	

L₁S agarの組成

トリプトース	10g
肉エキス	5g
KH_2PO_4	6g
クエン酸三アンモニウム	2g
グルコース	20g
亜硝酸ナトリウム	15g
ツィーン 80	1g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	57.5mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	120mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	34mg
寒天	18g
pH 5.5、1,000ml処方	

MPN agarの組成

ラクトース	2g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5g
K_2HPO_4	0.1g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5g

菌体調製

抗菌薬乃至抗薬原体等として使用の本発明微生物の生菌体及び死菌体の各調製法の1例を示せば次の通りである。

1. 生菌体調製例

前記各微生物等の菌体を前述のロズサ液体培地(*L. rosea* 11-
esの場合)若しくはGAM液体培地(*B. l. idobacterium*の場合)52
に接種し、37℃にて8時間前後好氣的又は嫌氣的に静置培養し、
後者は嫌氣培養して生菌数 10^8 /mlの培養液をつくり、得られた
培養液を12,000rpmの遠心分離機に付し菌体を集め、生理食塩
水で洗浄した後、生理食塩水に懸濁して菌液 $50\text{mg}(10^{11}/\text{ml})$ を得
る。

2. 死菌体(加熱処理菌体)調製例

上記1の生菌体調製例に従って得られた菌体を生理食塩水で2
回洗浄した後、生理食塩水(0.85% NaCl 水溶液)に懸濁して得ら
れる菌液 $50\text{mg}(10^{11}/\text{ml})$ を121℃で10分間加熱し、死菌体懸濁液
を得る。

特開昭62-145026(8)

実施例1

1. 薬理効果

後記実験例に示す通り、本発明の抗発癌剤は、ジメチルニトロソアミンの体内レベルを極めて効果的に低下せしめるものであり、したがって、消化器癌(とくに胃癌、肝臓癌)を初めとする癌の予防薬として有用なものである。

本発明剤は又、経口、静注等の手段で投与され得、その用量は通常0.1mg~10g/kg体重、より好ましくは1mg~1g/kg体重程度であり、その剤型としては、生体食塩水等への懸濁液剤、凍結乾燥等による製水剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤等々、通常の剤型を適当なキャリア、増量剤、整剤剤等と共に適宜選択使用し得る。

2. 急性毒性

後記実験例に示す通り、本発明剤のLD₅₀値は生体より成るものの場合3.4~7.2mg/マウス(腹腔内投与)、死体より成るものの場合はいずれの菌にあって50mg/マウス(腹腔内投与)以上である。

又、経口投与の場合は生体、死体とも実質的に無毒剤である。

実験例1

S. faecium A D1008, *S. faecalis* A D9005, *S. aureus* A D2007を前記死体菌調製例に従って、加熱処理菌体懸濁液を得、これを死菌体試料(菌体湿重量8mg/ml)とした。これらの試料にジメチルニトロソアミン84μgを添加し、37℃にて1時間反応させた後、遠心分離し、その上清につき、紫外吸収(225nm)を測定した。ジメチルニトロソアミン80μg添加のみの紫外吸収を100として、死菌体試料添加による減少量、及び減少率(%)を計算した。その結果を第5表に示す。

第5表

菌 体 名	ジメチルニトロソアミン減少量	減少率
	(μg)	(%)
<i>S. faecium</i> A D1008	53.4	66.8
<i>S. faecalis</i> A D9005	37.9	47.1
<i>S. aureus</i> A D2007	36.8	46.0

なお同重量の生菌体懸濁液についても前記第5表と同様な結果を得る。

実験例2

B. adolescentis A D0052, *B. brevis* A D0055, *B. longum* A D0056の前記死体菌調製例に従って得た死菌体懸濁液について、前記実験例1と同様の方法でジメチルニトロソアミン減少量及び減少率(%)を測定した。

その結果を第6表に示す。

第6表

菌 体 名	ジメチルニトロソアミン減少量	減少率
	(μg)	(%)
<i>B. adolescentis</i> A D0052	57.6	72.0
<i>B. brevis</i> A D0055	43.4	54.3
<i>B. longum</i> A D0056	40.8	50.1

なお同重量の生菌体懸濁液についても前記第6表と同様な結果を得る。

実験例3

L. acidophilus A D0006, *L. fermentum* A D0007, *L. salivarius* A D0008, *L. brevis* A D0011の前記死体菌調製例に従って得た加熱処理菌体懸濁液について、前記実験例1と同様の方法でジメチルニトロソアミン減少量及び減少率(%)を測定した。

その結果を第7表に示す。

第7表

菌 体 名	ジメチルニトロソアミン減少量	減少率
	(μg)	(%)
<i>L. acidophilus</i> A D0006	28.2	35.2
<i>L. fermentum</i> A D0007	24.2	30.3
<i>L. salivarius</i> A D0008	27.3	34.1
<i>L. brevis</i> A D0011	24.6	30.8

なお同重量の生菌体懸濁液においても前記第7表と同様な結果を得る。

特開昭62-145028(7)

実験例4

ICR系マウス(雄6週齢、平均体重 $21.0 \pm 0.5g$)を使用し、前記生菌体調製例に従って得られた生菌体をマウス当たり10mg、1mg、0.1mgの3段階の生菌体(各群10匹)を含む生肌食塩水懸液5.5mlを腹腔内投与し、14日間マウスの生死を観察した。

Bchrons-kärber法に従って算出したLD₅₀値(菌体重量/マウス)を第8表に示す。

尚、死菌体の場合は、いずれの菌にあってもLD₅₀値は50mg/マウス以上(腹腔内投与)であり、且つ経口投与ではいずれの場合でも実質的に無毒性であった。

第8表

<u>S. faecium</u> A D 1993	7.1 mg
<u>S. avium</u> A D 2097	7.2 mg
<u>B. adolescentis</u> A D 0052	4.4 mg
<u>B. longum</u> A D 0056	3.9 mg
<u>L. acidophilus</u> A D 0008	6.8 mg
<u>L. casei</u> A D 0049	5.0 mg

製剤例

1. 前記生菌体調製例に従って得られたB. adolescentis A D 0052生菌体又は死菌体の凍結乾燥物50mg(菌体数 5×10^{10} 個に相当)を精製でんぷん末950mgと均一に混合、打錠して経口投与用錠剤とした。この錠剤は体重50kgの成人における用量 10^{10} 個/kgに相当する。

2. 上記凍結乾燥物500mgを精製でんぷん末500mgと混合、打錠したものは、同様に用量 10^{10} 個/kgに相当する。

このように、本発明剤は前記菌体菌量等に基づいて、菌体と薬学的に非容され得る担体とを混合して所定の活性を有する所望の剤型とすることができる。

特許出版人 株式会社アドバンス開発研究所